

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.



⑯ BUNDESREPUBLIK

DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑯ Patentschrift

⑯ DE 196 28 178 C 1

⑯ Int. Cl. 6:

G 01 N 27/62

G 01 N 35/10

B 01 L 3/02

G 01 N 1/28

H 01 J 49/00

AT

81

⑯ Aktenzeichen: 196 28 178.4-52
⑯ Anmeldetag: 12. 7. 96
⑯ Offenlegungstag: —
⑯ Veröffentlichungstag
der Patenterteilung: 18. 9. 97

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

⑯ Patentinhaber:

Bruker-Franzen Analytik GmbH, 28359 Bremen, DE

⑯ Erfinder:

Franzen, Jochen, 28359 Bremen, DE

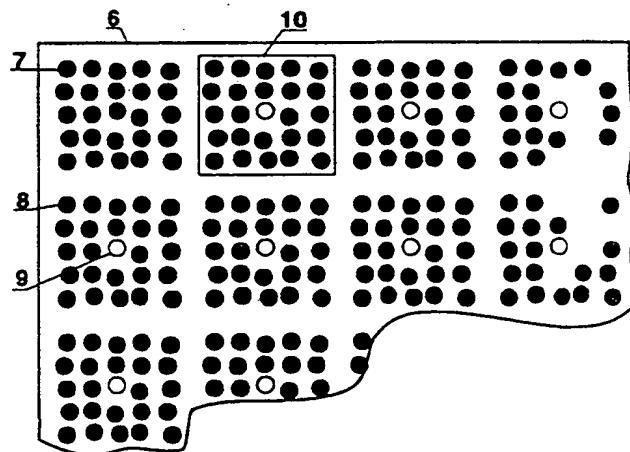
⑯ Für die Beurteilung der Patentfähigkeit
in Betracht gezogene Druckschriften:

US 54 98 545

⑯ Verfahren zum Beladen von Probenträgern für Massenspektrometer

⑯ Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum schnellen Beladen großflächiger Probenträger mit einer sehr großen Anzahl von Analysenproben für deren massenspektrometrischen Untersuchung mit dem Ionisierungsverfahren der matrixunterstützten Desorption durch Laserbeschuß (MALDI).

Die Erfindung besteht in der Verwendung der in der Biochemie und Molekulargenetik eingeführten Mikrotiterplatten für die parallele Vorbereitung einer Vielzahl von gel-ten Proben und einer Vielfachpipetteneinheit für die gleichzeitige Übertragung von Probenlösungenmengen aus allen Reaktionsgefäßen einer Mikrotiterplatte auf den Probenträger. Durch Wiederholung der Beladung mit Proben aus weiteren Mikrotiterplatten, die versetzt zwischen die bereits aufgebrachten Proben gesetzt werden, kann eine sehr hohe Probendichte erreicht werden. Dabei werden einige der Proben am Rande für die genaue massenspektrometrische Feststellung der Probenpositionierung auf dem Probenträger reserviert, die Positionen der übrigen Proben können dann interpoliert werden.



DE 196 28 178 C 1

DE 196 28 178 C 1

Beschr ibung

5 Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum schnellen Beladen großflächiger Probenträger mit einer sehr großen Anzahl von Analysenproben für deren massenspektrometrischen Untersuchung mit dem Ionisierungsverfahren der matrixunterstützten Desorption durch Laserbeschuß (MALDI).

10 Die Erfindung besteht in der Verwendung der in der Biochemie und Molekulargenetik eingeführten Mikrotiterplatten für die parallele Vorbereitung einer Vielzahl von gelösten Proben und einer Vielfachpipetteneinheit für die gleichzeitige Übertragung von Probenlösigmengen aus allen Reaktionsgefäßern einer Mikrotiterplatte auf den Probenträger. Durch Wiederholung der Beladung mit Proben aus weiteren Mikrotiterplatten, die versetzt zwischen die bereits aufgebrachten Proben gesetzt werden, kann eine sehr hohe Probendichte erreicht werden. Dabei werden einige der Proben am Rande für die genaue massenspektrometrische Feststellung der Probenpositionierung auf dem Probenträger reserviert, die Positionen der übrigen Proben können dann interpoliert werden.

15 Allgemeiner Stand der Technik

20 Die Ionisierung biomolekularer oder polymerer Proben durch matrixunterstützte Desorption vermittelst Beschuß mit kurzzeitigen Lichtblitzen aus einem Puls laser hat in den vergangenen Jahren weite Verbreitung gefunden und wird besonders in Flugzeitmassenspektrometern, aber auch in Quadrupol-Hochfrequenz-Ionenfallen oder in Ionen-Cyclotron-Resonanz-Spektrometern verwendet. Diese Methode wird mit "MALDI" bezeichnet (matrix assisted laser desorption/ionization).

25 Diese Ionisierungsmethode verlangt, daß die auf der Oberfläche eines Probenträgers aufgebrachten Proben in das Vakuumsystem des Massenspektrometers eingebracht werden müssen. Dabei ist es Stand der Technik, ein größere Anzahl von Proben (ungefähr zehn bis hundert) gemeinsam auf einem Probenträger einzuschleusen, und den Probenträger im Vakuumsystem so zu bewegen, daß die gewünschte Probe jeweils in den Fokus der Laseroptik zu liegen kommt.

30 Die Analysenproben werden in Form kleiner Tröpfchen einer Probenlösung auf den Probenträger gebracht, wobei die Tröpfchen sehr schnell trocknen und einen für MALDI geeigneten Probenfleck hinterlassen. Dabei wird in der Regel der Lösung eine Matrixsubstanz für den MALDI-Prozeß beigegeben, und die Probenstoffe werden beim Auskristallieren der Matrixsubstanz während der Trocknung in die Kristallchen eingeschlossen. Es sind aber auch schon andere Verfahren bekannt geworden, bei denen die Probenstoffe auf eine zunächst aufgegebene, bereits getrocknete Matrixschicht aufgegeben werden.

35 Durch den raschen Fortschritt in der MALDI-Technik zeichnet sich eine Automatisierung der Probenionisierung ab, die nach heutiger Technik noch durch den Benutzer visuell gesteuert wird, und zwar unter mikroskopischer Betrachtung der Probenflecke. Die Automatisierung eröffnet die seit langem geforderte Möglichkeit zu einer massiv-parallelen Verarbeitung von einigen zehntausend Proben pro Tag auch in der massenspektrometrischen Analyse, die in anderen Bereichen der Biochemie und Molekulargenetik längst eingeführt ist. Damit werden größere Probenträger als bisher üblich verlangt, und eine hohe Dichte der Analysenproben auf dem Probenträger.

40 In der Biochemie und der Molekulargenetik haben sich sogenannte Mikrotiterplatten für die parallele Verarbeitung vieler Proben durchgesetzt. Die Korpusgröße dieser Platten beträgt 80 mal 125 Millimeter, mit einer nutzbaren Fläche von 72 mal 108 Millimeter. Es gibt bereits heute kommerziell erhältliche Probenvorbereitungssysteme, die mit Mikrotiterplatten dieser Größe arbeiten. Diese enthielten ursprünglich auf der nutzbaren Fläche von 72 mal 108 Millimeter 96 austauschbare kleine Reaktionsgefäße in einem 9-mm-Raster. Heute haben sich Platten der gleichen Größe mit 384 fest im Kunststoff eingelassenen Reaktionsgefäßen im 4,5-mm-Raster durchgesetzt. Platten mit 864 Reaktionsgefäßen im 3-mm-Raster sind in Diskussion. Die massiv-parallele Verarbeitung von Proben, beispielsweise in der molekularen Genetik, besteht nun darin, nicht nur mit einer einzigen solchen Mikrotiterplatte zu arbeiten, sondern mit einer großen Anzahl solcher Platten parallel. Beispielsweise können bei gleichzeitiger Behandlung von 120 solcher Platten in einer einzigen PCR-Apparatur (PCR = polymerase chain reaction) mehr als 46 000 DNA-Proben gleichzeitig in einer Zeit von etwa 3 Stunden jeweils milliardenfach vervielfältigt werden.

45 Bisher werden in der kommerziellen Massenspektrometrie unterschiedliche Probenträger mit bis zu 30 Millimeter Durchmesser, in anderen Systemen bis 50 mal 50 Millimeter Größe benutzt. Diese erscheinen für zukünftige Anforderungen zu klein. Aus obigen Betrachtungen gegenwärtig entwickelte Forderungen gehen dahin, Zehntausende von Proben täglich untersuchen zu können. Es können dafür viele Probenträger eingesetzt werden, die einem Massenspektrometer automatisch zugeführt werden, wie es US 5 498 545 beschreibt. Eine solche Automatik ist jedoch sehr kompliziert, und es erscheint viel zweckmäßiger, die Zehntausende von Proben auf einem einzigen Probenträger unterzubringen.

50 Die Anzahl von Proben auf einem Probenträger ist heute meist durch die lange Zeit zum Aufbringen der Proben und durch die Verderblichkeit der Proben begrenzt. Sollen etwa 40 000 Analysenproben auf einen Träger aufgebracht werden, und dauert das Aufbringen einer Probe jeweils nur zwei Sekunden (wobei die Übertragungspipette kaum vernünftig sauber gewaschen werden kann), so dauert der gesamte Beladungsvorgang bereits mehr als 22 Stunden. Bei vielen MALDI-Verfahren werden Matrixsubstanzen verwendet, die bei langem Aufenthalt an Luft oxydieren oder hydrolysieren und damit ihre Wirksamkeit für den MALDI-Prozeß verlieren. Auch sind biomolekulare Proben manchmal nicht stabil und müssen in Lösung gekühlt aufbewahrt werden. Sie können nicht stundenlang oder sogar tagelang der Laborluft und Laborwärme ausgesetzt werden.

55 Massenspektrometrische Untersuchungen mit massiv-paralleler Behandlung dieser Art werden für Fragen der Genotypisierung, für das Feststellen individueller Genmutationen und für viele andere Fragestellungen

gebraucht.

Aufgabe der Erfindung

Es ist die Aufgabe der Erfindung, ein Verfahren zu finden, mit dem sich geeignete Probenträger relativ schnell und sicher mit Zehntausenden von Analysenproben, die in Mikrotiterplatten aus Ausgangsproben erzeugt, gezüchtet und sonst vorbehandelt worden sind, so beladen lassen, daß sie einer automatisch arbeitenden massenspektrometrischen Untersuchung zugänglich werden.

Beschreibung der Erfindung

10

Es ist der Grundgedanke der Erfindung, den Probenträger in Größe und Form den Mikrotiterplatten anzupassen, ihn bereits mit einer MALDI-Schicht vorzupräparieren und alle (beispielsweise 384) Analysenproben aus einer Mikrotiterplatte gleichzeitig auf die MALDI-Schicht zu übertragen. Für diese Übertragung eignet sich eine an sich bekannte Vielfach-Pipetteneinheit, die genau so viele Pipetten besitzt wie die Mikrotiterplatte Reaktionsgefäß hat, und deren Mikropipetten den gleichen Rasterabstand besitzen wie die Reaktionsgefäß der Mikrotiterplatte. Bei Verwendung von Mikrotiterplatten mit 384 Analysenproben lassen sich so 384 Proben gleichzeitig übertragen und in einem Punktraster mit 4,5 Millimeter Punktabstand auf der MALDI-Schicht ablegen.

Durch Säubern der Multipipetten, Wechsel der Mikrotiterplatten und Wiederholen dieses Vorgangs kann dann ein zweites Punktraster mit wiederum 384 Analysenproben aus einer zweiten Mikrotiterplatte auf denselben Probenträger aufgetragen werden, wobei dieses Punktraster gegenüber dem ersten um eine kleine Strecke verschoben wird. Durch Wiederholen dieses Verfahrens kann man auf dem Trier 384 Probenpunktblöcke erzeugen, wobei jeder Probenpunktblock eine Vielzahl von Proben enthält, deren jede von einer anderen Mikrotiterplatte stammt.

Beispielsweise kann man bei einem Punktblock aus 5 mal 5 Punkten insgesamt $5 \times 5 \times 384 = 9600$ Proben auftragen, wobei die Probenpunkte einen Abstand von maximal 0,9 Millimeter zueinander haben können. Die Probenflecken können dabei ohne Schwierigkeiten einen Durchmesser von je etwa 0,6 Millimeter besitzen. Es ist sogar möglich, Punktblöcke von 11 mal 11 Punkten mit 400 Mikrometern Punktabstand und 300 Mikrometer Probenfleckendurchmesser aufzubringen. Das ergibt Probenträger mit insgesamt 46464 Proben. Es können, wie unten gezeigt wird, sogar noch viel mehr Analysenproben aufgebracht werden.

Der Probenträger kann zur Vorbereitung für den MALDI-Prozeß beispielsweise mit einer Lackschicht aus Nitrozellulose versehen werden, wobei dem Lack eine geeignete protonierende Matrixkomponente beigegeben ist. Solche Beschichtungen wurden in den Patentbegehren BFA 34/96 und 36/96 beschrieben. Diese Lackschicht ist außerordentlich adsorptiv für Proteine und DNA. Die Moleküle der Analysensubstanz werden sehr gleichmäßig auf der Oberfläche adsorbiert und ermöglichen so eine Automatisierung des MALDI-Vorgangs der Ionisation. Die Lackschicht explodiert beim Beschuß mit Laserlichtblitzen im Fokusbereich des Laserlichts und setzt so die Biomoleküle frei, ohne sie dabei zu zersetzen. Die heißen Gase aus der Explosion kühlen sich durch adiabatische Ausdehnung in das umgebende Vakuum hinein so schnell ab, daß die großen Biomoleküle kaum eine Aufheizung erfahren. Ionen der beigemischten, protonierenden Matrixkomponente agieren dann in der Gasphase mit den großen Biomolekülen und bewirken deren Ionisierung. Es können aber auch die Biomoleküle schon chemisch so vorbehandelt sein, daß sie selbst bereits im festen Zustand eine Ladung tragen und so bevorzugt als Ionen freigesetzt werden. Die Ionen der Analysensubstanz werden dann im Massenspektrometer untersucht, beispielsweise (im einfachsten Falle) auf ihr Molekulargewicht hin.

Die Vielfach-Pipetteneinheit enthält die Pipetten genau im Rasterabstand der Reaktionsgefäß der Mikrotiterplatte. Die Pipetten können also räumlich genau und zeitlich gleichzeitig in die Reaktionsgefäß hineingreifen und dort Lösung entnehmen. Sie können beispielsweise in kleinen Stahlkapillaren von 200 Mikrometer Außendurchmesser enden, die in konisch zugespitzten Halterungen außerordentlich genau im Raster der Mikrotiterplatten von 4,5 Millimeter angeordnet sind. Mit ihnen lassen sich auf der MALDI-Schicht des Probenträgers sehr präzise Probenflecke von 200 Mikrometer Durchmesser erzeugen, die genau im Raster der Mikrotiterplatten angeordnet sind. Diese Probenflecke reichen für eine einfache massenspektrometrische Untersuchung aus. Die Pipetten können als Vielzahl einzelner Mikroliterspritzen mit gemeinsamer Bewegung der Kolben ausgeführt sein.

Viel einfacher sind jedoch passive Pipetten, die eher wie Bedruckungsstempel arbeiten. Sie bestehen aus kleinen Edelstahldrähten von beispielsweise 200 Mikrometer Durchmesser ohne innere Kapillaröffnung, wiederum in konisch zugespitzten Halterungen eingepaßt. Die ganz leicht hydrophilen Pipettendrähte nehmen sehr genau dosierte winzige Tröpfchen aus der Probenlösung auf, die an der Stirnseite der Drähte hängen, und geben sie durch Gravitations- und Kapillarkräfte auf dem Probenträger an die MALDI-Schicht ab. Die MALDI-Schicht ist leicht hydrophob, daher laufen die Tröpfchen auf der Schicht nicht auseinander und können zu einem Probenfleck von etwa 200 Mikrometer Durchmesser eingetrocknet werden.

Die passiven Pipetten können an der Stirnfläche mit geeigneten Schichten beschichtet sein, beispielsweise mit einer Schicht, die die Probenmoleküle bevorzugt an der Oberfläche bindet und somit der Probenlösung anreichernd entzieht. Ist die Adsorption dieser Schicht geringer als die der MALDI-Schicht auf dem Probenträger, so lassen sich dort die Probenmoleküle wieder bevorzugt auf die MALDI-Schicht ablagern.

Es ist eine weitere Erfindungsidee, daß die in Lösung positiv oder negativ geladenen Analysenmoleküle durch elektrophoretische Wanderung an die passiven Pipettendrähte herangeholt und so aufkonzentriert werden können, indem die Pipettendrähte mit einer elektrischen Spannung gegenüber den Mikrotitergemäßen versehen werden. Die Gegenelektroden können in den Wänden der Gefäße integriert sein (beispielsweise durch halblei-

tende Wände), sie können aber auch getrennt von den Pipettendrähten mit der gleichen Vi pipetteneinheit eingeführt werden. Die entnommenen Tröpfchen enthalten dann wesentlich mehr Analysenmoleküle, als es der Konzentration der Analysenmoleküle in der Lösung, die sich in den Mikrotitergemäßen befindet, entspricht. Eine Zersetzung der Probenmoleküle an den Pipettendrähten kann durch geeignete Belegung vermieden werden. Die mit dem Tröpfchen auf die MALDI-Schicht transportierten Probenmoleküle können durch eine Umpolung der Elektrophoresespannung auf die MALDI-Schicht gebracht werden.

Diese Vielfachpipettensysteme werden durch automatisch arbeitende Bewegungssysteme in drei Achsen bewegt. Sie haben dabei längere Wege zurückzulegen und müssen sich daher recht schnell bewegen können. Sie müssen sich mindestens von der Mikrotiterplatte zum Probenträger, von dort zu einer Wasch- und Trocknungsstation und wieder zurück zu einer neuen Mikrotiterplatte bewegen. Durch diese Anforderungen ist ihre Positionsgenauigkeit eingeschränkt, mit vertretbaren Kosten lassen sich Systeme bauen, die eine Positioniergenauigkeit von etwa 50 Mikrometern haben.

Diese Positioniergenauigkeit lässt die oben geschilderten Probenblöcke mit 11 mal 11 Punkten mit 400 Mikrometer Probenfleckraster und 200 Mikrometer Probenfleckdurchmesser durchaus zu, aber es wird dann erforderlich, die Position der Rasterpunkte relativ zu den anderen Rasterpunkten von Proben aus anderen Mikrotiterplatten im Massenspektrometer zu überprüfen. Dazu sind mindestens zwei Probenblöcke erforderlich, die möglichst weit voneinander entfernt sein sollen. Mit diesen zwei Probenblöcken lassen sich im Massenspektrometer durch Abtasten die Positionen der einzelnen Proben zueinander bestimmen. Aus den Positionen der Probenpunkte in zwei Probenblöcken lassen sich die Positionen aller anderen Probenpunkte interpolieren, auch wenn neben einem Parallelversatz noch ein Winkelversatz herrschen sollte.

Es ist also ein weiterer Gedanke der Erfahrung, mindestens zwei Probenblöcke für die Messung der Positionierung der Proben vorzusehen. Am besten werden in diesen Probenblöcken Proben mit bekannten Substanzen eingesetzt, um die Abtastung zu erleichtern. Aus Sicherheitsgründen ist es zweckmäßig, nicht nur zwei, sondern vier Blöcke hierfür vorzusehen, und dazu die Blöcke in den vier Ecken des Probenträgers zu verwenden. Es bleiben dann noch 380 Probenblöcke für die Analysen unbekannter Substanzen.

Ein weiterer Aspekt betrifft die Sicherheit des Analysierens des richtigen Probenflecks auf der Trägerplatte. Es ist daher ein weiterer Gedanke der Erfahrung, einen Probenfleck aus jedem Probenblock mit einer bekannten Referenzsubstanz zu belegen und so eine Kontrolle für die richtige Ansteuerung zu haben. Bei Verwendung der vier Eckblöcke für eine Positionskalibrierung, und je einer Probe aus jedem Block für eine Ansteuerungskontrolle bleiben immer noch 45 600 Analysenproben übrig. Die folgende Tabelle gibt einen Überblick der Anzahl nutzbarer Analysenproben in Abhängigkeit von der Blockgröße:

Proben pro Block (Anzahl der Titerplatten)	maximaler Abstand	Anzahl nutzbarer Analysenproben
$3 \times 3 = 9$	1,50 mm	3 040
$4 \times 4 = 16$	1,12 mm	5 700
$5 \times 5 = 25$	0,90 mm	9 120
$6 \times 6 = 36$	0,75 mm	13 300
$7 \times 7 = 49$	0,64 mm	18 240
$8 \times 8 = 64$	0,56 mm	23 940
$9 \times 9 = 81$	0,50 mm	30 400
$10 \times 10 = 100$	0,45 mm	37 620
$11 \times 11 = 121$	0,40 mm	45 600
$12 \times 12 = 144$	0,37 mm	54 340
$13 \times 13 = 169$	0,34 mm	63 840
$14 \times 14 = 196$	0,32 mm	74 100
$15 \times 15 = 225$	0,30 mm	85 120

Natürlich können abweichend von der Tabelle auch nicht-quadratische Blöcke verwendet werden, wenn das günstiger erscheint, beispielsweise bei ungleichen Positionsgenauigkeiten in x- und y-Richtung.

Die Werte in der Tabelle sind bei einem Probenfleckdurchmesser von 0,20 Millimeter alle noch mit einer Positionsgenauigkeit von 0,05 Millimeter vereinbar. Natürlich können bei 3×3 Proben pro Block die Fleckdurchmesser viel größer gewählt werden. Bei einer durchschnittlichen Zeit von einer Minute für einen Beladungszyklus ist der Probenträger für die Proben aus $11 \times 11 = 121$ Mikrotiterplatten in etwa zwei Stunden beladen, bei $15 \times 15 = 225$ Mikrotiterplatten in weniger als vier Stunden.

Es kommt vor, daß empfindliche Proben nicht lange der Luft ausgesetzt werden dürfen. Das kann bei langen

Beladungszeiten zu einem Problem werden. In diesem Fall ist es möglich, die ganze Beladungsapparatur mit Schutzgas zu füllen und auch die Probenträgerplatten anschließend in Schutzgas geschützt zum Massenspektrometer zu transportieren. In einem zeitgleich eingereichten Patentbegehren (Aktenzeichen BFA 38/96) wird eine Kassettenkonstruktion vorgestellt, in der die Probenträger in Schutzgas gelagert, transportiert und ins Massenspektrometer eingeführt werden können.

Selbstverständlich kann die Erfindung auch auf andere Mikrotiterplatten mit anderen Rasterabständen sinngemäß übertragen werden.

Beschreibung der Bilder

Fig. 1 zeigt einen Abschnitt einer Vielfach-Pipetteneinheit (1) über einem Abschnitt einer Mikrotiterplatte (4). Die einzelnen Pipetten haben Schäfte (2), an deren konisch zugespitzten Enden sich die Pipettenkapillaren (3) befinden. Die Pipetten können in die eingelassenen Reaktionsgefäß (5) der Mikrotiterplatte (4) eingeführt werden und dort gleichzeitig aus allen Reaktionsgefäß je eine kleine Menge Probenlösung entnehmen, die dann auf den Probenträger übertragen wird.

Fig. 2 zeigt einen Eckabschnitt des Probenträgers (6) nach Beladung mit Proben. Die Probenflecke sind in Blöcken (10) zu je 5×5 Probenflecken angeordnet. Die Blöcke haben unter sich einen Rasterabstand, der dem der Reaktionsgefäß auf der Mikrotiterplatte entspricht. Die 25 Proben eines Probenblocks (10) stammen jeweils aus einer anderen Mikrotiterplatte. Die Probenflecken bilden kein exaktes 5×5 -Raster, da die Positionierung der Vielfach-Pipetteneinheit beim Aufbringen der Proben nicht ganz genau erfolgte. Die relative Positionierung innerhalb benachbarter 5×5 -Blöcke ist jedoch gleich. Daher kann man durch messendes Abtasten eines solchen Blocks im Massenspektrometer die Position aller Probenflecke genau bestimmen, wenn nur eine Parallelverschiebung der Flecken zu erwarten ist. Ist zusätzlich ein Winkelversatz zu erwarten, so müssen zwei Blöcke vermessen werden. Der Block mit den Probenflecken (7) in der Ecke des Probenträgers besteht aus Probesubstanzen, die sich leicht für eine solche Positionskalibrierung abtasten lassen. Die weißen Probenflecke (9) sind Referenzsubstanzen, die eine Kontrolle der Ansteuerung erlauben. Die schwarzen Probenflecken (8) sind die unbekannten Analysenproben.

Besonders günstige Ausführungsformen

Die Probenträger werden nach dieser Erfindung in ihrer Größe genau an die der Mikrotiterplatten angepaßt. Sie können dann in kommerziell erhältlichen Verarbeitungsplätzen für Mikrotiterplatten eingeführt und bearbeitet werden. Diese Plätze haben sich in der Biochemie für die parallele Verarbeitung vieler Proben durchgesetzt. Die Korpusgröße dieser Platten beträgt 80 mal 125 Millimeter, mit einer nutzbaren Fläche von 72 mal 108 Millimeter, auf der sich heute meist 384 fest im Kunststoff eingelassenen Reaktionsgefäß im 4,5-mm-Raster befinden.

Werden in Zukunft Mikrotiterplatten mit 864 Reaktionsgefäß im 3-mm-Raster eingeführt, so können diese wegen der gleichen Größe ebenfalls verwendet werden. Es sind dann die Pipetteneinheiten und die Punktraster für die Probenblöcke zu ändern. Die Beladung geht dann schneller, da dann jeweils 864 Proben gleichzeitig übertragen werden.

Die Erfindung beruht auf der bereits eingeführten massiv-parallelen Verarbeitung von Proben in Biochemie und molekularer Genetik. Diese wird auch für die Vorbereitung der massenspektrometrisch zu analysierenden Proben eingesetzt.

Die Probenträger in der Größe der Mikrotiterplatten müssen mit einer MALDI-Schicht versehen werden. Das kann im biochemischen Labor geschehen, wird aber in Zukunft vorzugsweise durch industrielle Vorpräparation vorgenommen werden. Die MALDI-Schicht kann beispielsweise aus einer lackartigen Schicht aus Nitrozellulose bestehen, wobei dem Lack eine geeignete protonierende Matrixkomponente beigegeben ist. Solche Beschichtungen wurden in den Patentbegehren BFA 34/96 und 36/96 beschrieben.

Diese Lackschicht ist außerordentlich adsorptiv für Peptide, Proteine und DNA. Die Moleküle der Analysen-Substanzen werden sehr gleichmäßig auf der Oberfläche adsorbiert und ermöglichen so eine Automatisierung der MALDI-Ionisation.

Diese Schicht muß nun mit den Proben belegt werden, die in den Mikrotiterplatten vorbereitet wurden. Dazu eignen sich an sich bekannte Vielfach-Pipetteneinheiten, deren Einzelpipetten im Rastermaß der Reaktionsgefäß der Mikrotiterplatten angeordnet sind.

Die einfachste Ausführungsform einer Vielfach-Pipetteneinheit besteht aus einer Platte, in die im Rastermaß der Reaktionsgefäß der Mikrotiterplatte Bolzen eingeschraubt sind, in deren konisch zugespitztem Ende die Pipettendrähte eingelassen sind. Die Pipettendrähte ragen nur sehr kurz, etwa einen Millimeter, aus dem Bolzenschaft heraus, um ein Dejustieren zu vermeiden. Die Drähte sind so abgeschliffen, daß ihre Stirnflächen genau in einer Ebene liegen. Sie werden so beim Eintauchen in die gleich hoch gefüllten Reaktionsgefäß der Mikrotiterplatte in gleicher Weise mit Probenlösung benetzt, und nehmen beim Herausheben gleiche Mengen an Probenlösung mit. Die Durchmesser der Pipettendrähte bestimmen dabei die zukünftige Größe des Probenfleckens auf dem Probenträger.

Die Vielfach-Pipetteneinheit kann jedoch auch Kapillarpipetten tragen, die ähnlich wie Mikroliterspritzen aufgebaut sind. Mit ihnen lassen sich größere Mengen an Probenlösung überführen.

Die Übertragung der Proben auf den Probenträger muß sehr präzise erfolgen. Sie kann kaum von Hand ausgeführt werden. Es bietet sich dafür ein automatischer Bewegungsmechanismus an, der die Vielfach-Pipetteneinheit sehr präzise dreidimensional bewegen kann. Solche Bewegungseinheiten lassen sich mit Hilfe von Linearmotoren aufbauen, sie können dabei Wege von etwa einem Meter Länge mit Geschwindigkeiten von

etwa 20 Metern pro S kunde und Positioni rgenauigkeiten von 50 Mikrometern durchfahren. Die Bewegungseinheit kann neben der Vielfach-Pipetteneinheit auch noch eine Roboterhand tragen, die die Mikrotiterplatten aus einem Magazin zu einer festen Zwischenstation bringen kann.

Mit einer solchen Bewegungseinheit läßt sich das Beladungsverfahren eines Probenträgers, der sich in einer Trägerstation befindet, nach dieser Erfindung mit folgendem Zyklus durchführen:

Die Roboterhand holt die erste Mikrotiterplatte aus dem Magazin, in dem sich etwa 60 Mikrotiterplatten befinden, und legt sie präzise positioniert in der Zwischenstation ab. Dann wird die Vielfach-Pipetteneinheit in die Reaktionsgefäße der Mikrotiterplatte eingeführt, wobei die Pipettendrähte benetzt werden. Die Pipetteneinheit wird herausgehoben, wobei an den Pipettendrähten Lösungströpfchen von etwa 200 Mikrometer Durchmesser zurückbleiben. Die Pipetteneinheit wird dann zur Trägerstation verbracht, und nach möglichst genauer Positionierung und nach Ausklingen restlicher Schwingungen bis auf 50 Mikrometer über den Probenträger abgesenkt. Dabei berühren die Tröpfchen die MALDI-Schicht des Probenträgers. Beim nachfolgenden Abheben der Pipetteneinheit bleiben die größeren Teile der Tröpfchen auf der MALDI-Schicht zurück, sie trocknen dann unter der Einwirkung von trockner, warmer Luft innerhalb von etwa 30 Sekunden ein.

Die Pipetteneinheit wird währenddessen zu einer Waschstation gefahren, wo sie in Wasser, das mit Trifluoresigsäure angesäuert ist und in dem sich auch noch Bürsten befinden, gereinigt wird. Die Bewegungseinheit kann die Pipetteneinheit waschend über die feststehenden Bürsten bewegen. Eine zweite Waschstation enthält reines Wasser. Danach werden die Pipetten in einem warmen Strom trockener Luft getrocknet.

Im nächsten Schritt bringt die Roboterhand die Mikrotiterplatte zurück in das Magazin und entnimmt die nächste Platte. Der volle Zyklus dauert etwa 60 Sekunden. Dieser Zyklus kann sofort wiederholt werden, bis der Probenträger voll beladen oder das Magazin mit Mikrotiterplatten leer ist. Dieses muß dann gewechselt werden.

Die Punkt muster werden für die Mikrotiterplatten leicht versetzt aufgebracht, so daß die Probenblöcke entstehen, die in Fig. 2 gezeigt sind. Die dort gezeigten Blöcke mit 24 Analysenproben und einer Referenzprobe ergeben bei 380 nutzbaren Reaktionsgefäßen pro Mikrotiterplatte genau 9 120 Analysenproben, die in nur 25 Minuten aufgebracht werden. Das mag für viele Zwecke genug sein. Bei dieser Zahl entfällt auch das Wechseln des Magazins, die Beladung kann vollautomatisch erfolgen.

Werden höhere Anzahlen an Analysen benötigt, beispielsweise für medizinische Reihenuntersuchungen zur Suche nach gefährdenden Mutationen, so können beispielsweise Probenblöcke mit $11 \times 11 = 121$ Probenflecken aufgebracht werden. Hier ist es zweckmäßig, zur höheren Sicherheit die Proben zweimal an verschiedenen Stellen aufzutragen und wiederum eine Referenzsubstanz pro Block aufzubringen. Es werden somit die Proben aus 60 Mikrotiterplatten und einer Mikrotiterplatte mit Referenzsubstanz entnommen, damit ist wiederum nur ein Magazin notwendig, und die Beladung kann wieder vollautomatisch ohne Unterbrechung verlaufen. Das Beladen braucht dafür etwas über zwei Stunden.

In der Regel sind die voll beladenen Probenträger vor der Analyse im Massenspektrometer noch weiter zu behandeln. So ist es zweckmäßig, den Probenträger zu waschen, um alle Salze und Puffersubstanzen von der Oberfläche zu entfernen. Die Moleküle der biochemischen Analysensubstanzen sind in der Regel so fest adsorbiert, daß sie bei einem vorsichtigen Waschvorgang nicht entfernt werden. Es kann dabei in Grenzfällen notwendig sein, alle Metallionen, die leicht zu Adduktbildung neigen, mit besonderen chemischen oder physikalischen Mitteln von der Oberfläche zu entfernen. Die Trägerplatte ist danach gut zu trocknen, um nicht zuviel Wasser in das Massenspektrometer einzuführen.

Die Probenträger werden dann in die Ionenquelle eines geeigneten Massenspektrometers eingeschleust und dort analysiert. Im Falle der 11×11 Probenflecken müssen dann 22 800 Proben analysiert werden, wobei für jede Probe eine Doppelmessung vorzunehmen ist. Die insgesamt 45 600 Analysen können in 25,3 Stunden durchgeführt werden, wenn jede Analyse genau zwei Sekunden dauert. Zusätzliche Zeit wird für die Positionsabtastung und für die Analyse der Referenzproben benötigt. Um die Analysen in einem Tag durchführen zu können, ist es also zweckmäßig, auf Analysenzeiten unter zwei Sekunden zu kommen.

Für empfindliche Proben kann es notwendig sein, den gesamten Beladungsvorgang in einem beispielsweise mit großen Glasscheiben gedichteten Automaten unter Schutzgas auszuführen. Auch der Transport der fertig beladenen Probenträger zum Massenspektrometer kann unter Schutzgas geschehen.

Die Pipettenspitzen können auch für die Anreicherung der Probenmoleküle mit geeigneten Schichten versehen werden, die die Probenmoleküle binden. Auch eine elektrophoretische Anreicherung kann verwendet werden. Die gebundenen Probenmoleküle können auch durch eine elektrophoretische Spannung auf die MALDI-Schicht übertragen werden.

Patentansprüche

1. Verfahren zum schnellen Beladen einer MALDI-Probenträgerplatte mit einer großen Anzahl in Lösung befindlicher Proben aus Mikrotiterplatten, dadurch gekennzeichnet, daß die MALDI-Probenträgerplatte bereits mit einer Matrixschicht für die matrixunterstützte Laserdesorption und Ionisierung belegt ist, und daß die Übertragung der kleinen Mengen an Probenlösung auf die Matrixschicht für alle Proben einer Mikrotiterplatte gleichzeitig erfolgt.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß zur gleichzeitigen Übertragung der Proben aus einer Mikrotiterplatte eine Vielfachpipette benutzt wird, mit so vielen Einzelpipetten wie der Anzahl der Probegefäß in der Mikrotiterplatte entspricht, so daß auf der MALDI-Probenträgerplatte ein Punkt muster an Probenflecken im Raster der Mikrotiterplatten entsteht.
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Vielfachpipette aus einer Vielfalt von Einzelstempeln besteht, an denen jeweils Tröpfchen mit der gelösten Probe hängenbleiben und so übertragen werden können.

4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Probenmoleküle durch eine Elektrophoresespannung zwischen den Probenlösungen und den Pipettenspitzen an die Pipettenspitzen anreichernd herangeholt werden. 5

5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Probenmoleküle durch Umkehr der Elektrophoresespannung von den Pipettenspitzen auf die MALDI-Probenträgerplatte feriert werden. 5

6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die MALDI-Probenträgerplatte die gleiche Größe besitzt wie die Mikrotiterplatten. 10

7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß Proben für eine MALDI-Probenträgerplatte aus mehreren Mikrotiterplatten entnommen werden, und daß die Punktmuster der Proben aus verschiedenen Mikrotiterplatten von Titerplatte zu Titerplatte geringfügig gegeneinander versetzt aufgebracht werden. 10

8. Verfahren nach Anspruch dadurch gekennzeichnet, daß die Proben aus verschiedenen Mikrotiterplatten auf der MALDI-Probenträgerplatte jeweils Blöcke von Probenflecken bilden, wobei ein solcher Block kleiner ist, als es der Rasterfläche eines Reaktionsgefäßes auf der Mikrotiterplatte entspricht. 15

9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Proben aus 25 Mikrotiterplatten mit je 384 Probengefäßen in Blöcken zu 5 mal 5 Probenflecken mit einem maximalen Rasterabstand von 0,9 Millimetern bei maximal 0,8 Millimeter Probenfleckdurchmesser aufgebracht werden, so daß sich nach dem Beladen 9600 Probenflecken auf dem Probenträger befinden. 15

10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Proben aus 121 Mikrotiterplatten zu je 384 Probengefäßen in Blöcken zu 11 mal 11 Probenflecken mit einem maximalen Rasterabstand von 0,4 Millimetern bei maximal 0,3 Millimeter Probenfleckdurchmesser aufgebracht werden, so daß sich nach dem Beladen 46 464 Probenflecken auf der MALDI-Probenträgerplatte befinden. 20

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 8 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß jeweils einige Blöcke am Rande der MALDI-Probenträgerplatte nach Einbringen des Probenträgers in das Massenspektrometer zur Feststellung der genauen Positionen der Probenflecken relativ zu den anderen Proben des Blockes und relativ zur MALDI-Probenträgerplatte dienen. 25

12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß die vier Blöcke in den Ecken der MALDI-Probenträgerplatte für diese Feststellung der relativen Positionen dienen. 30

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 8 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß jeweils ein Probenfleck aus den Blöcken für Zwecke der Qualitätssicherung aus einer bekannten Substanz besteht. 30

14. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche 8 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß für Zwecke der Qualitätssicherung durch Doppelmessungen jede Probe aus jeder Mikrotiterplatte durch zweimalige Übertragung der Proben aus jeder Mikrotiterplatte zweimal an verschiedenen Stellen aufgetragen wird. 30

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen

35

40

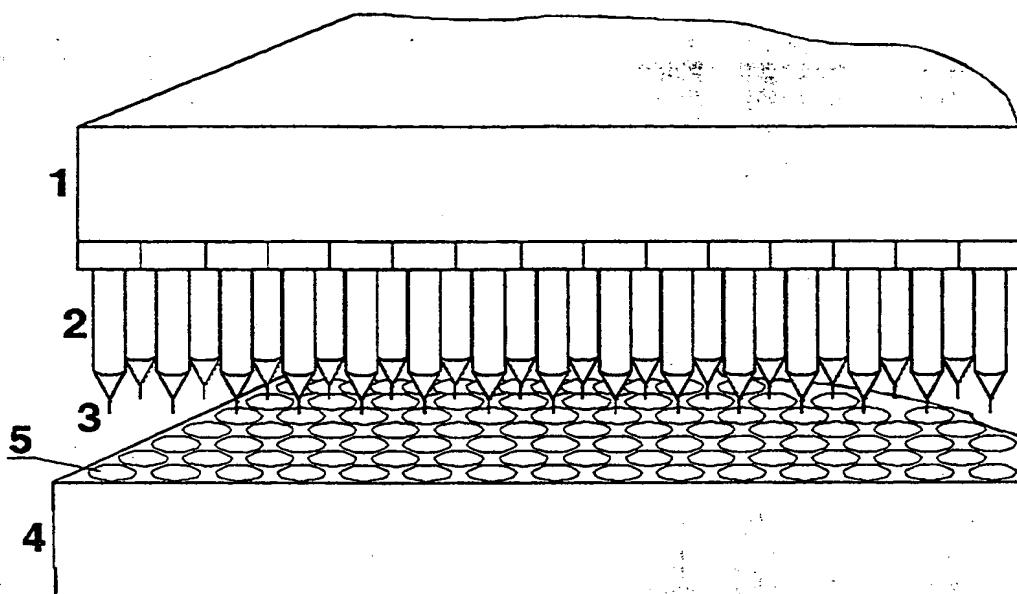
45

50

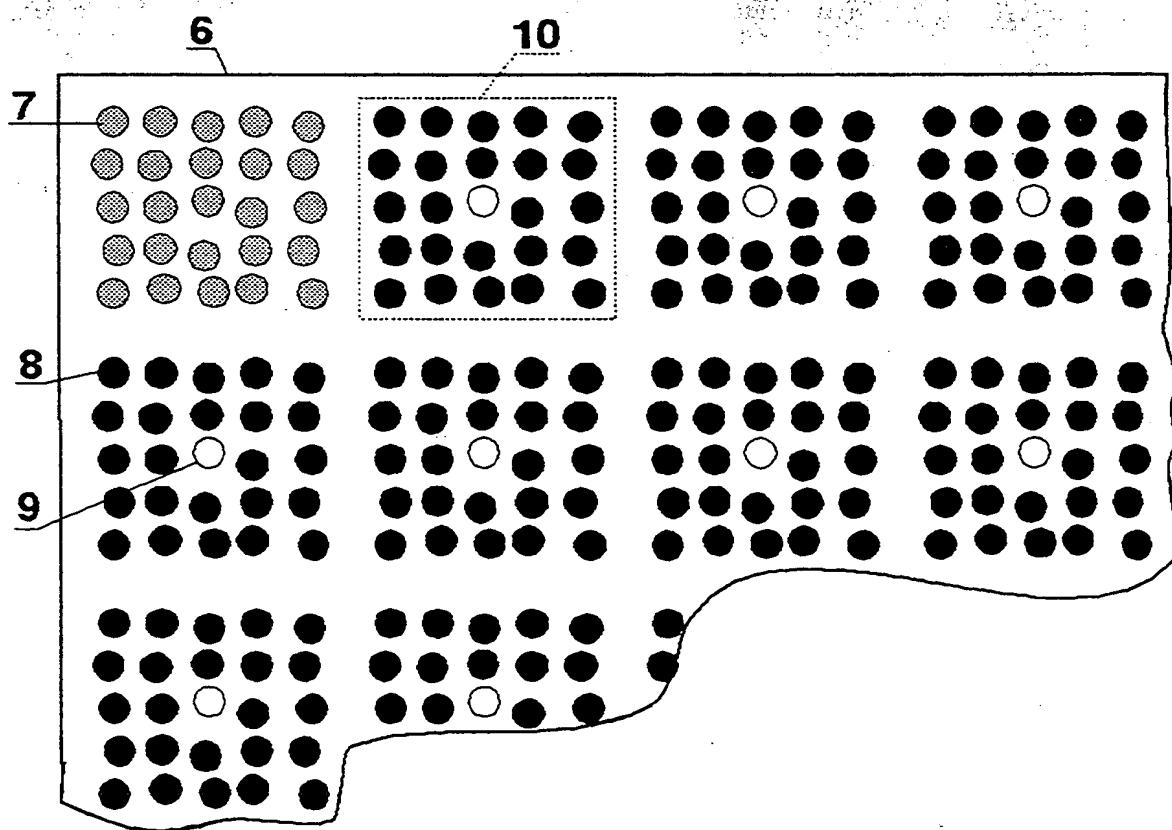
55

60

65



Figur 1



Figur 2